

Extracellular ATP and Dibutyl cAMP Enhance the Freezability of Rat Epididymal Sperm

Hideaki Yamashiro,^{1,4,*} Masaaki Toyomizu,² Natsuki Toyama,¹ Nobuya Aono,¹ Masahiro Sakurai,¹ Yuuki Hiradate,¹ Masaki Yokoo,³ Stefan Moisyadi,⁴ and Eimei Sato¹

We studied the effects of ATP, ionomycin, and dibutyl cAMP (dbcAMP) on the motility, freezability, and oxygen consumption of rat epididymal sperm. In vitro fertilization and intrauterine insemination were performed by using frozen-thawed rat sperm. Frozen-thawed sperm diluted in raffinose-modified Krebs-Ringer bicarbonate solution-egg yolk extender containing 1.85 mM ATP and 100 μ M dbcAMP exhibited considerably higher motility and viability than sperm diluted in dbcAMP-free extender. Addition of ionomycin and dbcAMP to ATP-containing extenders did not alter the oxygen consumption rate of sperm, suggesting that extracellular ionomycin and dbcAMP are not involved in the mobilization of mitochondrial energy substrates in sperm. Further, high rates of pronucleus formation and progression to the blastocyst stage were observed in embryos produced by the fertilization of oocytes with fresh sperm in an in vitro fertilization medium supplemented with ATP and dbcAMP. Oocytes were not penetrated by frozen-thawed sperm when cocultured with cumulus-oocyte complexes in a medium without ATP and dbcAMP. In contrast, cryopreserved sperm penetrated oocytes when the gametes were cultured in an ATP- and dbcAMP-containing medium, and the resultant embryos formed blastocysts. Our results show that the dilution of rat sperm in raffinose-modified Krebs-Ringer bicarbonate solution-egg yolk extender supplemented with ATP and dbcAMP prior to sperm cryopreservation enhances the freezability of the cryopreserved sperm. Furthermore, the in vitro fertilization medium we developed effectively supports the production of embryos from both fresh and cryopreserved rat sperm.

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; dbcAMP, dibutyl cAMP; IVF, in vitro fertilization; mKRB, modified Krebs-Ringer bicarbonate.

The basic mechanochemical event underlying sperm motility is ATP-induced microtubule sliding.¹ Adenosine triphosphatase associated with the dynein arms on outer-doublet microtubules provides the energy required for this process.³⁰

ATP, calcium, and cAMP have received considerable attention as potential primary regulators of sperm motility in several species of animals.^{2,15,16} Extracellular ATP acts on sperm by triggering a purinergic receptor-mediated increase in the intracellular calcium level; this increase may produce several downstream effects that enhance sperm motility.^{18,26} Increased calcium levels presumably activate soluble adenylyl cyclase, thereby increasing the cAMP concentration in sperm.^{1,3,17} cAMP induces protein phosphorylation by activating protein kinase A^{9,13} and mediates calcium influx into sperm via the CatSper calcium ion channels.^{6,10,23} In addition, cAMP may elevate mitochondrial calcium levels,⁸ thereby activating the calcium-dependent dehydrogenases involved in the Krebs cycle and providing ATP required for sperm motility.

Previously, we showed that rat sperm become freezable when diluted in ATP-containing raffinose-modified Krebs-Ringer bicarbonate solution (mKRB)-egg yolk extender.³² This finding indicates the existence of a unique pathway that utilizes extracellular ATP in rat sperm and suggests that extracellular ATP produces several downstream effects that improve sperm motility by increasing calcium levels or by activating cAMP

signal transduction pathways. Further elucidation of the role of extracellular ATP in the energy-synthetic processes and motility-regulation system of rat sperm could lead to improved motility, freezability, and fertilizing ability of the sperm.

We, therefore, evaluated the freezability of rat epididymal sperm preserved in raffinose-mKRB-egg yolk extender with ATP, ionomycin (a calcium ionophore), and dibutyl cAMP (dbcAMP; a membrane-permeable cAMP analog) under various conditions. We also determined the effects of these agents on oxygen consumption by sperm. Sperm cryopreservation was considered successful if frozen-thawed sperm fertilized oocytes. To improve the effectiveness of in vitro fertilization (IVF), we determined whether ATP- and dbcAMP-supplemented IVF media improve the fertilizing ability of sperm. We also attempted artificial insemination with frozen-thawed rat sperm.

Materials and Methods

Principles of laboratory animal care were followed during this study, and all procedures were conducted in accordance with guidelines of the Ethics Committee for Care and Use of Laboratory Animals for Research of the Graduate School of Agricultural Science (Tohoku University, Japan). Wistar rats were used throughout the experiments. Animals were kept in polycarbonate cages (25 × 40 × 20 cm) under controlled conditions with lights on at 0800 and off at 2000 h. They were given food and tap water *ad libitum*.

Raffinose-mKRB-egg yolk extender. We used raffinose-mKRB-egg yolk freezing solution containing 0.1 M raffinose, 32.37 mM sodium D,L-lactate, 50 μ g/mL streptomycin, and 75 μ g/mL penicillin (all from Sigma, St Louis, MO) and 94.6 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.71 mM CaCl₂·2H₂O, 1.19 mM

Received: 02 Jul 2009. Revision requested: 06 Aug 2009. Accepted: 08 Sep 2009.

¹Laboratory of Animal Reproduction, and ²Laboratory of Animal Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, and ³Innovation of New Biomedical Engineering Center, Tohoku University, Sendai, Japan; ⁴Institute for Biogenesis Research, Department of Anatomy and Reproductive Biology, John A Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, HI.

*Corresponding author. Email: hideaki@hawaii.edu

MgSO₄·7H₂O, 1.19 mM KH₂PO₄, 25.07 mM NaHCO₃, 0.5 mM sodium pyruvate, and 5.56 mM glucose (all from Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Egg yolk (20% v/v) was added to the solution. Egg-yolk lipids were solubilized by adding 0.04% (w/v) SDS (Wako) as described previously.^{31,32}

Sperm motility. Sperm motility was assessed by using a sperm motility analysis system (version 1.0, Kashimura, Tokyo, Japan) and a previously described protocol.^{5,32} Acrosome integrity.

Acrosomes of fresh and frozen-thawed sperm were assessed by staining with FITC-conjugated peanut agglutinin (Wako).³¹

Rat epididymal sperm collection. Sexually mature Wistar male rats older than 15 wk were euthanized by cervical dislocation. Both caudae epididymides were excised, rinsed, and carefully blotted free of blood and adipose tissues. A small part of the cauda epididymis was excised with fine scissors, and the sperm droplet that subsequently welled up was transferred to a 1.5-mL microfuge tube containing 1 mL freezing medium at 37 °C. After 5 min, the tube was assessed macroscopically to determine whether the sperm were dispersed adequately.

Cryopreservation and thawing. We investigated the effect of various concentrations of ionomycin (Sigma) in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extenders on the motility of fresh and frozen-thawed sperm. Sperm samples from both caudae epididymides of 3 rats were collected and immediately suspended in 1 mL raffinose-mKRB-egg yolk extender containing 1.85 mM ATP and 0, 5, 10, 15, or 20 μM ionomycin. Each suspension was incubated at 37 °C for 5 min to ensure sperm dispersal, and the sperm concentration and motility then were evaluated with the sperm motility analysis system. Sperm were processed and frozen by using a previously described method with modifications.³¹ Diluted sperm samples were cooled to 5 °C for 90 min and further diluted to a ratio of 1:1 with the previously mentioned extenders to which a commercial cryoprotectant (Equex STM, Nova Chemical Sales, Scituate, MA) was added to 1.5%. The sperm concentration after dilution was 5 × 10⁶ sperm/mL. The samples were equilibrated at 5 °C for 30 min before freezing and loaded into standard 0.5-mL straws. Next, a tube rack made from stainless steel was put into the polystyrene box (17 × 27 × 17 cm), and the box was filled with liquid nitrogen until 2 cm below the level of the tube rack. The heat-sealed straws were placed in the tube rack, exposed to liquid nitrogen vapor for 10 min, plunged into liquid nitrogen (~196 °C), and stored for 3 d at this temperature. The straws were thawed in water (37 °C) for 10 s, transferred to 1.5-mL microfuge tubes, and incubated at 37 °C for 5 min. Thereafter, sperm motility parameters were assessed.

We next analyzed the characteristics of fresh and frozen-thawed sperm stored in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extenders supplemented with dbcAMP (Sigma) at various concentrations. In brief, sperm samples were collected from the caudae epididymides of 3 male rats, divided into 5 aliquots, and suspended in extender solution containing 1.85 mM ATP and 0, 100, 200, 300, or 400 μM dbcAMP. The suspensions were cooled to 5 °C for 90 min, and equal volumes of the previously mentioned extender solutions containing 1.5% cryoprotectant were added. The resultant solutions were equilibrated at 5 °C for 30 min, frozen, and stored in liquid nitrogen. The straws were thawed rapidly by holding them in water at 37 °C for 10 s. Sperm were transferred to a 1.5-mL microfuge tube and incubated at 37 °C for 5 min. Sperm motility (%), straight-line velocity (μm/s), curvilinear velocity (μm/s), and amplitude of lateral head displacement (μm) were evaluated after incubation for 3 h. Acrosome integrity was evaluated by staining frozen-thawed sperm with FITC-conjugated peanut agglutinin.

Oxygen consumption by sperm. We assessed the effects of ionomycin and dbcAMP in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk medium on sperm mitochondrial activity. Sperm samples were collected from 5 mature male rats and diluted in ATP-free raffinose-mKRB-egg yolk medium at 37 °C for 5 min to permit sperm dispersal. Equal aliquots of the samples were resuspended in raffinose-mKRB-egg yolk medium containing 3.7 mM ATP (control), 20 μM ionomycin, or 200 μM dbcAMP; thus the final ATP, ionomycin, and dbcAMP concentrations were halved. Oxygen-consumption rates were measured using Clark-type oxygen electrodes (Rank Brothers, Cambridge, UK); the electrodes were maintained at 37 °C for 10 min and calibrated with air-saturated water (presumed oxygen concentration, 406 nmol/mL) at 37 °C. Sperm samples (1 mL each) were suspended in a reaction chamber (final concentration, approximately 1 × 10⁷ sperm/mL) and carefully stirred to avoid introduction of external air. Data were acquired by using a commercial software program (LabChart version 5.2, AD Instruments, Castle Hill, Australia). The oxygen consumed by the sperm were calculated as described previously.²⁵

Oxygen concentration (nmol oxygen/mL) =
oxygen (U) × oxygen concentration of air-saturated water (that is, 406 nmol oxygen/mL) ÷
oxygen full-chart span (U)

The rates of oxygen consumption by sperm were expressed as nmol/min/1 × 10⁷ sperm.

IVF and embryo culture. After IVF and culture, embryo development was examined as described previously.¹² mKRB medium containing 4 mg/mL bovine serum albumin (BSA, Sigma) was used for fertilization. For subsequent culture, we used modified rat 1-cell embryo culture medium (ARK Resource, Kumamoto, Japan). The fertilization and culture media were prepared in polystyrene culture dishes covered with paraffin oil (Nacal Tesque, Kyoto, Japan) and equilibrated overnight in a CO₂ incubator (Hirasawa, Tokyo, Japan; 5% CO₂ in air at 37 °C).

Superovulation was induced in immature rats as described previously.¹⁹ In brief, female rats (age, 28 to 33 d) were injected intraperitoneally with 10 IU pregnant mare serum gonadotropin (Serotropin, Teikoku Zoki, Tokyo, Japan) and, after 48 h, with 10 IU human chorionic gonadotropin (Puberogen, Sankyo, Tokyo, Japan). After 13 to 15 h, the rats were euthanized by cervical dislocation. Their oviducts were isolated, blotted with sterilized filter paper to remove the liquid and blood on the external surfaces, and added to dishes containing 100 μL mKRB-BSA medium. The cumulus-oocyte complexes in the oviducts were collected by flushing excised oviducts with mKRB-BSA.

Fresh sperm were obtained from male rats as described previously. Frozen-thawed sperm in dbcAMP- and ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extenders were used. In brief, fresh epididymal sperm were suspended in 1 mL mKRB-BSA medium with or without 1.85 mM ATP and 100 μM dbcAMP (concentration, 1 × 10⁷ sperm/mL). Both sperm suspensions were warmed in an incubator for 5 min, and 10 μL of each was transferred to fresh dishes containing drops of mKRB with 4 mg/mL BSA (90 μL; final concentration, 1 × 10⁶ sperm/mL). Frozen sperm were thawed in a water bath (37 °C) for 5 min and suspended in the aforementioned media. Next, 10 μL of each suspension was transferred to a fresh dish containing drops of mKRB-BSA medium (final frozen-thawed sperm concentration, 2 to 3 × 10⁶ sperm/mL). Immediately after sperm were added to the insemination medium, cumulus-oocyte complexes col-

lected from the oviducts of superovulated immature rats were carefully released into the sperm suspensions and incubated in the insemination medium at 37 °C in 5% CO₂ for 12 h. The eggs were freed from the cumulus cells, washed thrice with rat 1-cell embryo culture medium, and examined under phase-contrast microscopy to detect penetration and fertilization. Eggs containing sperm within the perivitelline space were defined as penetrated eggs. Penetrated eggs that exhibited pronucleus formation were considered to be undergoing fertilization. Eggs (20 to 30) with both female and male pronuclei with corresponding tails were cultured in 100 µL culture medium for 5 d in a CO₂ incubator. Embryos that progressed to the 2-cell, 4-cell, and blastocyst stages were counted at 24, 72, and 120 h of culture, respectively.

Intrauterine insemination of frozen-thawed sperm. Sperm were frozen in dbcAMP- and ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extenders, as described earlier. By using a previously described method,²⁰ fresh sperm collected from 6 mature male rats were injected into the uterine horns of 6 female Wistar rats, and frozen-thawed sperm were injected into the uterine horns of 27 female rats. In brief, sexually mature female rats were maintained on a 12:12-h light/dark cycle (lights on, 0800 to 2000 h) and introduced into cages containing sterile vasectomized male rats. In the evening (2200 to 2300 h) of day 0 (day of pseudopregnancy induction), fresh and thawed sperm (50 µL each; 20 to 30 × 10⁶ sperm/mL) were injected into the oviductal ends of the uterine horns of pseudopregnant rats.

Statistical analysis. The data were subjected to ANOVA and Fisher protected least-significant difference posthoc test (StatView, Abacus Concepts, Berkeley, CA). All data are expressed as the mean ± SEM. A *P* level of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of ionomycin in freezing extenders on cryopreserved rat sperm. We first examined the effect of ionomycin (0, 5, 10, 15, and 20 µM) in and ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk freezing extenders on the motility of fresh and frozen-thawed sperm. Sperm motility did not significantly differ between fresh and frozen-thawed sperm that were extended in ATP with raffinose-mKRB-egg yolk extenders containing 0, 5, 10, 15 and 20 µM ionomycin (Table 1).

Effect of dbcAMP in freezing extenders on cryopreserved rat sperm. This experiment aimed to determine whether the addition of the sperm-motility regulator dbcAMP (0, 100, 200, 300, and 400 µM) to ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extenders improves postthaw sperm motility. Frozen sperm in extender containing ATP and 100 µM dbcAMP were more motile than those in dbcAMP-free extender (Table 2). Frozen-thawed sperm incubated for 3 h at 37 °C in the ATP-containing extender supplemented with 100 µM dbcAMP exhibited significantly (*P* < 0.05) greater motility, straight-line velocity, and amplitude of lateral head displacement than did those in dbcAMP-free ATP-containing extender (Figure 1). Both before and after thawing, the proportion of sperm with intact acrosomes did not significantly differ among the sperm diluted in the various dbcAMP-containing extenders (Table 2).

Effect of ionomycin and dbcAMP in ATP-containing media on the oxygen consumption of sperm. Oxygen consumption by sperm was evaluated by incubation of sperm at 37 °C for 10 min in ATP-raffinose-mKRB-egg yolk medium with or without 10 µM ionomycin and 100 µM dbcAMP. No significant differences were noted in the oxygen-consumption rates among sperm cultured in any of the tested media (Figure 2).

Effects of ATP and dbcAMP in fertilization medium on the fertilizing ability of fresh and frozen-thawed sperm and on oocytes in vitro. To determine the optimal conditions for successful IVF, oocytes were fertilized with fresh and frozen-thawed sperm in mKRB-BSA medium with or without ATP and dbcAMP (Table 3). In medium without dbcAMP, 55% of oocytes were penetrated by fresh sperm, 48% exhibited pronuclei, and 22% developed into blastocysts. However when ATP and dbcAMP were added, these proportions were increased significantly (*P* < 0.05): 75% of oocytes were penetrated by fresh sperm, 67% had pronuclei, and 33% developed into blastocysts. Oocytes were not penetrated after coculture of cumulus-oocyte complexes with frozen-thawed sperm in mKRB-BSA medium. However, oocytes were penetrated (3%) when cocultured with frozen-thawed sperm in mKRB-BSA medium containing ATP and dbcAMP. Of the penetrated oocytes, 3%, 3%, 0.9%, and 0.9% progressed to the pronuclear, 2-cell, 4-cell, and blastocyst stages, respectively.

Fertilization after intrauterine insemination with frozen-thawed sperm. The fertilizing ability of frozen-thawed sperm after intrauterine insemination was assessed. After the injection of fresh sperm into 6 rats, 3 became pregnant and delivered 17 live rat pups. In contrast, when cryopreserved sperm were inseminated into the uteri of 27 rats, no live offspring were obtained.

Discussion

Both intracellular and extracellular ATP molecules play key roles in sperm function. Intracellular ATP is the main energy source driving sperm motility.²⁶ Extracellular ATP increases the calcium and cAMP levels in sperm.¹⁸ Intra- and extracellular calcium are crucial for functional sperm motility in several animal species.^{7,21,22} cAMP is generated from ATP during an adenylate-cyclase-mediated reaction in the protein kinase A pathway.^{1,27} Although cAMP also is associated with sperm motility,¹⁵ its role in the freezability of rat sperm has not been reported thus far.

We recently showed that rat sperm can be frozen successfully after incubating them in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk extender.³² This finding suggests that extracellular ATP has several downstream effects that increase the calcium and cAMP levels. These molecules may enhance sperm motility directly before cryopreservation or may be used as oxidative substrates in the mitochondria for ATP production and contribute to the remobilization of frozen-thawed sperm. We hypothesized that increasing the intracellular calcium and cAMP levels in rat sperm before cryopreservation would increase the oxygen-consumption rates of the sperm, enhance their motility, and ensure the survival of the cryopreserved sperm. To test this hypothesis, we first determined the effect of the calcium ionophore ionomycin in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk freezing extenders on the motility of fresh and frozen-thawed sperm. The motility of fresh and frozen-thawed sperm diluted in ATP-containing extender supplemented with ionomycin did not significantly differ from that of sperm diluted in ionomycin-free extender. This result suggests even in the presence of ATP, ionomycin did not enhance the freezability of rat sperm.

In the next experiment, we attempted to determine whether addition of the sperm-motility regulator dbcAMP to ATP-containing extenders improves sperm motility after thawing. Frozen-thawed sperm in ATP-containing extender supplemented with 100 µM dbcAMP were significantly more motile than those in dbcAMP-free extender. Moreover, the frozen-thawed sperm incubated for 3 h at 37 °C exhibited greater motility, straight-line velocity, and amplitude of lateral head displacement

Table 1. Effect of ionomycin in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk medium on various sperm characteristics after collection and thawing

Sperm characteristics		Ionomycin (μM)				
		0	5	10	15	20
After collection	Motility (%)	73.9 \pm 8.0	78.9 \pm 2.4	81.4 \pm 0.4	71.2 \pm 9.9	76.6 \pm 2.9
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	14.5 \pm 1.2	14.2 \pm 5.0	8.0 \pm 2.9	10.5 \pm 1.3	11.1 \pm 2.5
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	138.4 \pm 3.3	129.0 \pm 13.3	103.4 \pm 14.4	102.6 \pm 6.6*	104.8 \pm 16.0
	ALD (μm)	6.7 \pm 0.5	6.8 \pm 0.3	6.1 \pm 0.5	5.8 \pm 0.4	5.5 \pm 0.7
	BCF (Hz)	32.4 \pm 1.3	31.6 \pm 2.8	32.1 \pm 2.2	30.1 \pm 1.7	30.9 \pm 2.3
After thawing	Motility (%)	31.4 \pm 3.6	31.9 \pm 4.7	35.9 \pm 1.7	25.4 \pm 2.4	27.6 \pm 7.3
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	3.5 \pm 0.5	5.9 \pm 1.0	4.5 \pm 0.2	5.9 \pm 1.1	3.9 \pm 0.4
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	66.5 \pm 5.2	83.6 \pm 2.9	91.7 \pm 1.2	77.3 \pm 7.3	101.7 \pm 22.2
	ALD (μm)	2.9 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2	4.1 \pm 0.1	3.7 \pm 0.5	5.8 \pm 2.0
	BCF (Hz)	35.1 \pm 2.7	33.7 \pm 2.8	37.8 \pm 4.2	31.9 \pm 0.7	29.7 \pm 6.5

ALD, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity
 Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$).

*Value significantly ($P < 0.05$) different from control value.

Table 2. Effect of dbcAMP in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk medium on sperm characteristics after collection and thawing

Sperm characteristics		dbcAMP concentration (μM)				
		0	100	200	300	400
After collection	Motility (%)	63.3 \pm 9.1	80.0 \pm 5.8	71.4 \pm 10.7	52.5 \pm 15.1	29.6 \pm 9.9*
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	12.5 \pm 0.8	13.5 \pm 2.4	13.9 \pm 3.9	12.8 \pm 3.9	8.5 \pm 2.2
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	117.4 \pm 0.9	100.9 \pm 7.7	116.8 \pm 14.7	93.4 \pm 23.4	95.8 \pm 9.8
	ALD (μm)	6.7 \pm 0.3	5.1 \pm 0.4*	5.6 \pm 0.3	4.5 \pm 1.3*	4.4 \pm 0.6*
	BCF (Hz)	27.7 \pm 0.9	24.6 \pm 2.5	23.4 \pm 1.1	26.2 \pm 1.3	28.4 \pm 3.3
After thawing	Acrosome integrity (%)	87.9 \pm 5.8	90.5 \pm 4.5	86.4 \pm 5.1	88.0 \pm 4.9	89.7 \pm 4.2
	Motility (%)	28.5 \pm 8.3	43.3 \pm 2.8	34.9 \pm 3.3	29.0 \pm 3.8	14.1 \pm 0.9*
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	4.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.8	4.3 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2	4.9 \pm 1.9
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	88.9 \pm 12.9	89.3 \pm 10.2	72.5 \pm 4.4	88.4 \pm 5.8	74.6 \pm 9.5
	ALD (μm)	4.1 \pm 0.4	3.9 \pm 0.5	3.9 \pm 0.6	4.4 \pm 0.3	4.1 \pm 0.5
	BCF (Hz)	36.8 \pm 2.9	32.6 \pm 2.2	35.6 \pm 2.9	36.0 \pm 1.0	36.2 \pm 2.3
	Acrosome integrity (%)	76.0 \pm 7.8	77.7 \pm 8.2	76.9 \pm 4.6	71.4 \pm 8.0	69.3 \pm 7.1

ALD, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity
 Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$).

*Value significantly ($P < 0.05$) different from control value.

ment than those incubated in dbcAMP-free ATP-containing extender. Both before and after thawing, the proportion of sperm with intact acrosomes did not differ among sperm diluted in the various dbcAMP-containing extenders. Therefore, the addition of dbcAMP to ATP-containing extenders provided the best results with regard to the postthaw sperm motility, thermal resistance of sperm, and acrosome integrity. This finding may be attributed to the activation of the cAMP-dependent molecular signaling or signal-transduction systems in sperm by extracellular ATP before sperm cryopreservation.^{18,26} This activation may contribute to the remobilization of rat sperm after freezing and thawing. Oxygen consumption by sperm was evaluated after their incubation 37 °C for 10 min in ATP-containing medium with or without 10 μM ionomycin and 100 μM dbcAMP. Oxygen-consumption rates did not differ among sperm cultured in the media tested, suggesting that extracellular ionomycin and dbcAMP are not involved in the mobilization of mitochondrial energy substrates in sperm.

The role of cAMP in the enhancement of sperm motility is well established; further, cAMP is an important regulator of capacitation and the acrosome reaction.^{3,14} We sought to determine the optimal conditions for successful IVF with fresh and frozen-thawed rat sperm. Oocytes were fertilized with fresh and frozen-thawed sperm in mKRB-BSA medium with or without ATP and dbcAMP. When IVF was performed with fresh sperm, the resultant fertilization rates and the percentage of embryos that progressed to blastocysts were higher when mKRB-BSA medium containing ATP and dbcAMP was used than when the medium lacked ATP and dbcAMP. Frozen-thawed sperm failed to penetrate oocytes after coculture with cumulus-oocyte complexes in mKRB-BSA medium. In contrast, cryopreserved sperm cultured in ATP- and dbcAMP-containing mKRB-BSA medium successfully penetrated oocytes, and the resultant embryos progressed to blastocysts. These results indicate ATP and dbcAMP in the IVF medium may regulate intracellular cAMP levels. An increase in intracellular cAMP levels may mediate calcium influx into sperm through CatSper calcium

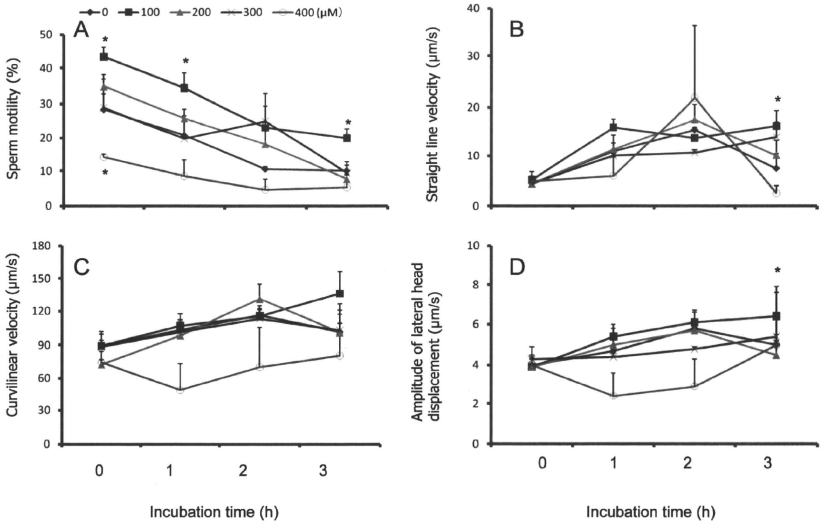


Figure 1. Effect of dbcAMP in ATP-containing raffinose-mKRB-egg yolk medium on the (A) motility, (B) straight-line velocity, (C) curvilinear velocity, and (D) amplitude of lateral head displacement of frozen-thawed sperm after incubation at 37 °C for 3 h. Values are presented as mean ± SEM (*n* = 3). *, value significantly (*P* < 0.05) different from control value.

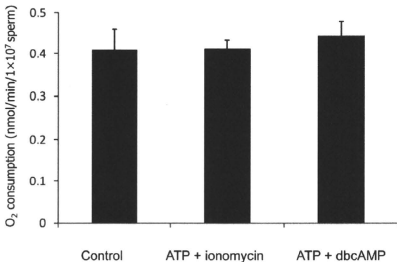


Figure 2. Effect of ionomycin and dbcAMP in raffinose-mKRB-egg yolk medium containing ATP on the oxygen consumption of fresh sperm after incubation at 37 °C for 10 min. Values are presented as mean ± SEM (*n* = 5). Supplementing ATP-containing medium with ionomycin and dbcAMP did not alter the oxygen consumption of fresh sperm.

ion channels^{6,10,23} or activate adenosine triphosphatase; sperm then become hyperactive and undergo the acrosome reaction.^{2,27} These changes augment the fertilizing ability of fresh and cryopreserved rat sperm. A recent article²⁹ also addressed the importance of cAMP and reported increased fertilization rates with frozen-thawed sperm that had been treated with the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methyl-xanthin.

We also assessed the fertilizing ability of frozen-thawed sperm by using intrauterine insemination. Three of the six

Wistar rats injected with fresh sperm became pregnant and delivered 17 live rat pups. In contrast, when cryopreserved sperm were inseminated into the uteri of 27 rats, no live offspring were obtained. Successful artificial insemination by using frozen-thawed rat sperm has been reported previously,²⁰ and a more recent publication by same group²⁸ confirmed that cryopreserved rat sperm can be revitalized and result in the birth of live offspring through embryo transfer after IVF. Although the authors²⁸ mentioned that intracytoplasmic sperm injection is the only way to routinely obtain offspring routinely derived from oocytes fertilized in vitro, the use of fresh and cryopreserved sperm in an in vitro fertilization protocol is not yet widespread.¹¹ Taken together, these findings indicate that protocols for sperm cryopreservation and oocytes fertilized in vitro by using cryopreserved sperm are still under development for safe preservation of most rat strains.

In conclusion, the cryopreservation of rat epididymal sperm in raffinose-mKRB-egg yolk extender supplemented with ATP and dbcAMP rendered sperm from Wistar rats freezable. Oocyte fertilization by fresh sperm and blastocyst formation from the fertilized oocytes were enhanced when the fertilization medium was supplemented with ATP and dbcAMP. Frozen-thawed sperm incubated in mKRB-BSA medium containing ATP and dbcAMP penetrated oocytes, and resultant embryos progressed to the blastocyst stage. This finding indicates that ATP- and dbcAMP-containing extenders improved the postthaw motility and fertilizing ability of cryopreserved rat sperm. Moreover, the IVF medium developed in the current study may be effective for the in vitro production of embryos from cryopreserved rat sperm. Further experiments are required to develop more

Table 3. Development of oocytes after IVF with fresh and cryopreserved rat sperm

	ATP+ dbcAMP	Total	No. (%) of total oocytes examined				
			Penetration	Pronuclear forma- tion ^a	2-cell embryos	4-cell embryos	Blastocysts
Fresh sperm	-	146	81 (55.5) ^b	71 (48.6) ^b	70 (48.0) ^b	57 (39.0) ^b	33 (22.6) ^b
	+	169	128 (75.7) ^c	113 (66.7) ^c	114 (67.5) ^c	104 (61.5) ^c	57 (33.7) ^c
Frozen sperm	-	132	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	+	102	4 (3.9)	4 (3.9)	4 (3.9)	1 (0.9)	1 (0.9)

^aTwo pronuclei with a sperm tail.

^{b,c}Values with different superscripts within the same column are significantly ($P < 0.05$) different.

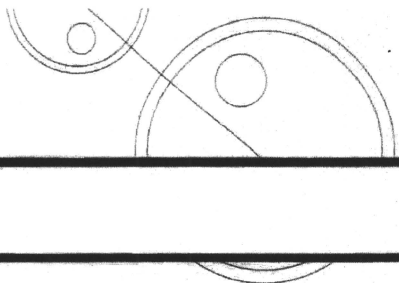
effective methods for artificial insemination and IVF using cryopreserved rat sperm.

Acknowledgment

This study was partly supported by grants 19658102 and 16108003 (to ES) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- Amory JK. 2007. Inhibiting sperm motility for male contraception: will the sperm tail be its 'Achilles heel'? *Mol Interv* 7:68-70.
- Aoki F, Sakai S, Kohmoto K. 1999. Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca²⁺ in hamster sperm. *Mol Reprod Dev* 53:77-83.
- Beltman C, Vacquier VD, Moy G, Chen Y, Buck J, Levin LD, Darszon A. 2007. Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 358:1128-1135.
- Brokaw CJ. 1972. Flagellar movement: a sliding filament model. *Science* 178:455-462.
- Cancel AM, Lobdel D, Mendola P, Perreault SD. 2000. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod* 15:1322-1328.
- Cook SP, Babcock DF. 1983. Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *J Biol Chem* 268:22408-22413.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 79:481-510.
- Degasperi GR, Velho JA, Zecchin KG, Souza CT, Velloso LA, Borecky J, Castilho RF, Vercesi AE. 2006. Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca²⁺. *J Bioenerg Biomembr* 38:1-10.
- Fujinoki M, Kawamura T, Toda T, Ohtake H, Ishimoda-Takagi T, Shimizu N, Yamaoka S, Okuno M. 2004. Identification of 36 kDa phosphoprotein in fibrous sheath of hamster spermatozoa. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137:509-520.
- Garbors DL. 2001. Ion channels. Swimming with sperm. *Nature* 413:579, 581-582.
- Hagiwara M, Choi JH, Devreddy RV, Roberts KP, Wolkers WF, Makhlouf A, Bischof JC. 2009. Cellular biochemistry during freezing of rat and mouse sperm predicts post-thaw motility. *Biol Reprod* 81:700-706.
- Jiang JY, Tsang BK. 2004. Optimal conditions for successful *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod* 71:1974-1979.
- Kinukawa M, Oda S, Shirakura Y, Okabe M, Ohmuro J, Baba SA, Nagata M, Aoki F. 2006. Roles of cAMP in regulating microtubule sliding and flagellar bending in demembrated hamster spermatozoa. *FEBS Lett* 580:1515-1520.
- Lefevre L, Jha KN, de Lamiande E, Visconti PE, Gagnon C. 2002. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 23:709-716.
- Lindemann CB. 1978. A cAMP-induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell* 13:9-18.
- Lindemann CB, Gibbons IR. 1975. Adenosine triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with Triton X-100. *J Cell Biol* 65:147-162.
- Litvin TN, Kamenskyy M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. 2003. Kinetic properties of 'soluble' adenylyl cyclase: synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278:15922-15926.
- Luria A, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H. 2002. Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod* 66:429-437.
- Mizutani E, Jiang JY, Mizuno S, Tomioka I, Shinozawa T, Kobayashi J, Sasada H, Sato E. 2004. Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes *in vitro*. *J Reprod Dev* 50:139-146.
- Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N. 2001. Generation of live rat offspring by intraterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Reproduction* 122:463-467.
- Publicover S, Harper CV, Barratt C. 2007. [Ca²⁺]_i signalling in sperm—making the most of what you've got. *Nat Cell Biol* 9:235-242.
- Publicover SJ, Gijoljas LC, Teves ME, de Oliveira GS, Garcia AA, Barratt CL, Harper CI. 2008. Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci* 13:5623-5637.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DL. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413:603-609.
- Reynafarje B, Costa LE, Lehninger AL. 1985. O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal Biochem* 145:406-418.
- Rodriguez-Miranda E, Buffone MG, Edwards EE, Ord TS, Lin K, Sammel MD, Gerton GL, Moss SB, William C. 2008. Extracellular adenosine 5'-triphosphate alters motility and improves the fertilizing capability of mouse sperm. *Biol Reprod* 79:164-171.
- Tash JS, Means AR. 1983. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 28:75-104.
- Seita Y, Ito J, Kashiwazaki N. 2009. Removal of acrosomal membrane from sperm head improves development of rat zygotes derived from intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Dev* 55:475-479.
- Seita Y, Sugio S, Ito J, Kashiwazaki N. 2009. Generation of live rats produced by *in vitro* fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* 80:503-510.
- Warner FD, Mitchell DR. 1980. Dynein: the mechanochemical coupling adenosine triphosphatase of microtubule-based sliding filament mechanisms. *Int Rev Cytol* 66:1-43.
- Yamashiro H, Han YJ, Sugawara A, Tomioka I, Hoshino Y, Sato E. 2007. Freezability of rat epididymal sperm induced by raffinose in modified Krebs-Ringer bicarbonate (mKRBC) based extender solution. *Cryobiology* 55:285-294.
- Yamashiro H, Toyomizu M, Kikusato M, Toyama N, Sugimura S, Hoshino Y, Abe H, Moisyadi S, Sato E. 2009. Lactate and adenosine triphosphate in the extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:155-161.



1 細胞の流れ

1. 生物における生殖戦略

1) 有性生殖と無性生殖

生物は生殖により子孫を作り、生命が引き継がれ、種が維持される。しかし、一口に生殖といっても、多様な生物が繰り返される生殖の仕組みにはいくつかの様式がある¹⁾ (図4.1)。最も単純なのはバクテリアなどの原生動物でみられる2分裂で、1個の個体が2個の個体に分裂するものである。分裂した個体は、しばらくすると栄養分を摂取して元の大きさに戻る。すなわち、単細胞生物では細胞分裂が生殖となる。また、ヒドラのように分裂する個体に大小がある場合には出芽と呼ぶ。太古の原始生命体も2分裂や出芽によって増殖したと推察される。このような分裂や出芽によって新しい個体を増やす生殖の仕方を無性生殖という。無性生殖によって増えた子孫は親と同じ遺伝子をもっており、安定した環境ではどんどん増えていけばよいので都合だが、環境が変化したときには新しい遺伝子の組合せがないので、種の環境適応性に劣ると考えられている。

そこで進化の過程で作り出されたのが、新たな遺伝子の組合せを生じる有性生殖である。有性生殖では、雄と雌で作られた生殖細胞、すなわち配偶子が融合して新しい個体が生じる。配偶子には形・大きさが同じ同型配偶子を作る生物と、配偶子の大きさや数に異なる異型配偶子を作る生物がいる。雌雄の作る異型配偶子で大型のものを卵子、小型のものを精子という。

2) 有性生殖の意義

有性生殖では無性生殖と比較して、生殖の様式が複雑になるので、そのための機構を発達させなければならぬ。そのようなことから、生殖の目的である個体数を増やすことにおいては、有性生殖は無性生殖に比べて不利である場合がある。しかしながら、自然界においては有性生殖を行う生物が多い。また、大腸菌のように無性生殖によって増える単細胞生物でも、接合によって2つの大腸菌のDNA間で部分的な組換えを行う場合がある。では、なぜ、このように生物は有性生殖を選択するのであろうか。有性生殖の意義として次のようなことが考えられている²⁾。

(1) 環境適応力の獲得

親のもつ形質は環境に適応しており、同じ環境においてはその環境に最大の適応度を示す無性生殖が優れている。すなわち親のクローンである子を作ることが生殖の意義にかなう。しかしながら、環境が変化すれば、適応が難しくなり、種が絶滅する危険性もある。そのようなことから、生物が生き続けるためにはこの遺伝子型に多様性を与え、環境変化に備える方が有利であるといえる。配偶子形成時に行われる減数分裂過程では、母方由来と父方由来の相同染色体の対がランダムに分配され、遺伝的に多様な生殖細胞を形成する。例えば、ヒトの場合、23対の相同染色体があるので、その組合せは2の23乗 (8.4×10^6) 通り考えられる。また、相同染色体間では交叉が起き、遺伝子の組換えも起こる。この交叉は2つの姉妹染色体とも、それぞれ別々に起こることが可能なため、結果として4本の染色体がすべて異なる組合せの遺伝子セットをもつことになる。つまり、減数分裂過程での相同染色体の組合せと交叉による遺伝子組換えにより、遺伝的多様性をほぼ無限に高めることができる (図4.2)。この多様性は、様々な環境の中で生存の場所を広げ、また環境の急激な変化の中で

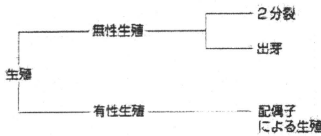


図 4.1 生物の生殖様式

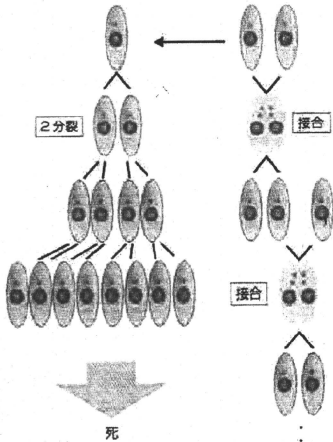


図 4.3 ソウリムシの接合（生殖核の交換）による若返り

柔軟に適応できる個体を生み出すのに有利に働くと考えられる。

(2) 遺伝子修復による若返り

遺伝子の組換えは、蓄積した有害な突然変異を除去し、細胞を若返らせるためにあるとする説である。例えば、ソウリムシ（単細胞生物）は、次々と2分裂によって増殖し、クローン集団を形成していくが、ある一定の回数、分裂を行うとクローン全体が突然、死滅する。しかし、それを選けるために、別のクローンに属するソウリムシ間で接合し、小核（ソウリムシは大核と小核をもち、小核は生殖核とも呼ばれる）の交換を行うと若返り、再び分裂を繰り返すことができるようになる（図4.3）。すなわち、接合やDNAの部分的交換によってそれまでの老化を帳消しにし、若返ることになる。一方、多細胞生物では、配偶子形成の中でみられる減数分裂過程で相同胞体間のDNAの相互の組換えが起こり、若返った配偶子が誕生する。すなわち、有性生殖は、単細胞生物においては個体の若返り、多細胞生物では配偶子の若返りにより、種の老化を防いでいる。

2. 不死の流れをもつ生殖細胞系列

これまで述べたように、有性生殖では雌雄の性をもち、精子と卵子の受精によって新しい個体が生じる。生物の個体には寿命があり、やがて老化して死を迎えるが、通常はその個体が死ぬ前に生殖細胞が体外に放出され、受精し胚となる。その後、胚の一部の細胞が始原生殖細胞に分化し、精子もしくは卵子となる。そして、再び精子と卵子が受精し、次世代の個体と生殖細胞を作る。このような観

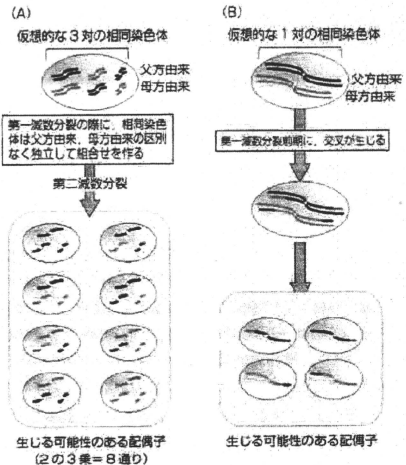


図 4.2 遺伝的多様性の獲得
相同胞体の組合せ (A) と交叉 (B) により、生殖細胞に遺伝的多様性が生まれる



図 4.4 「不死」の流れをもつ生殖系列細胞

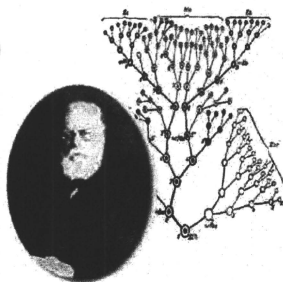


図 4.5 ワイズマンと生殖系列の世代間の連続性を示す模式図

点から、有性生殖を行う生物の個体を構成する細胞を大別すると、次の2種類になる。一つは、個体が生きている間は様々な働きをするもので、個体の死とともに消滅する「体細胞」であり、もう一つは、個体が生きている間はその個体にとって必要ではないが、次の世代の個体を作るための「生殖細胞」である。両者はともに複数の種類の細胞を含むことから、それぞれ「体細胞系列」および「生殖細胞系列」と総括的に呼ばれる。特に、有性生殖を行う生物の生殖細胞は、前述のような一連の流れをもつことから、生殖細胞系列は生命を継承する「不死」の流れをもつといえる²⁾(図4.4)。

3. 生殖細胞系列の起源

1) ワイズマンの生殖質連続説

この生殖細胞系列の区別は、ドイツの遺伝学者ワイズマン (August Weismann: 1834~1914, 図4.5) によって最初に認識された。ワイズマンは19世紀末に「生殖質連続説 (germ plasm hypothesis)」を唱えた。この説によれば、我々生物の体は「生殖質」と「体質」から形成されていることになる。そして、生物の遺伝と発生を司る細胞内の基本要素として決定子の存在を仮定し、すべての決定子である生殖質が生殖細胞の核の中に含まれ、個体発生や受精を通じて次々と受け継がれていくと考えた。つまり、生物は生殖質によって代々続いていくと考えたわけである。一方、生殖質以外の体質は、個体を作る体細胞に含まれ、発生とともに体質中の決定子は特定の細胞に振り分けられ、その結果、筋肉や神経などが分化するとしている。ワイズマンの仮説は現代の科学では受け入れられない部分もあるが、考え方としては今も生きている³⁾。

2) 生殖細胞系列の起源に関する諸説

これまでに生殖細胞の決定因子である生殖質については、多くの研究がなされているが、哺乳動物など生殖質が報告されていない動物は決して少なくなく、生殖細胞系列の起源については、いろいろな考え方が提出されている。ワイズマンが唱えた生殖質連続説のほかにも、生殖細胞系列が成立する時期を基にして次のような仮説も報告されている。

- ① 分離仮説 (segregation hypothesis) : 卵前期に一部の細胞が生殖細胞の起源細胞として分離する、とする説。
- ② 幹細胞仮説 (stem cell hypothesis) : 発生過程で各種の幹細胞が生じ、その中の一つが胚の体が構成され始める時期に生殖系列細胞へと運命づけられる、とする説。
- ③ 胚葉仮説 (germ layer hypothesis) : アルカリ性フォスファターゼ活性を指標に、生殖細胞が原腸陥入期後の特定の胚葉から出現する、とする説。

このように、生殖細胞系列の起源については様々な仮説が立てられている。しかしながら、現在ま

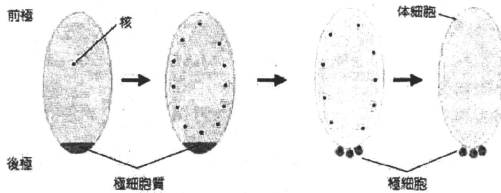


図 4.6 ショウジョウバエにおける生殖系列細胞の成立過程

でのところ、これらの仮説は生殖細胞形成の機構にまで発展する論理構造をもっていない。今後、生殖質の機能に関する分子機構が同定されれば、これらの仮説は、生殖質形成およびその特定細胞への分配機構を説明するものと理解できるようになるかもしれない。

4. 生殖細胞系列の成立過程

多くの動物群では、発生が進むと3つの胚葉（外胚葉、内胚葉、中胚葉）が形成される。それぞれの胚葉からは様々な組織・器官が分化するが、生殖腺は中胚葉から分化することがわかっている。完成した生殖腺（卵巣あるいは精巣）には、もちろん生殖細胞（卵子あるいは精子）が含まれるが、この卵子や精子も生殖腺と同じ中胚葉起源で一緒に分化するのだろうか。実は、将来、生殖細胞になる運命をもった細胞（始原生殖細胞）は、多くの動物群で発生過程の早い段階に、実際の生殖腺とは離れた部位で形成され出現する。すなわち、始原生殖細胞は生殖腺の外で分化し、将来、生殖腺になる場所（生殖隆起）まで移動する。この生殖細胞系列の成立過程は動物群によって多様である。以下に、生殖質が確認されている動物群の代表例としてショウジョウバエおよびアフリカツメガエルを、また、生殖質が確認されていない動物群の代表例としてマウスを取り上げ、それぞれの生殖細胞系列の成立過程を紹介する。

1) 生殖質をもつ動物群における生殖細胞系列の成立

(1) ショウジョウバエ

ショウジョウバエの卵子は中心に卵黄が多い心黄卵なので、表層卵割（表割）をする。表層卵割といっても、最初のうちは中心に近いところにある核のみが分裂を繰り返し、多核体を形成する。その後、増加した核が表層に移動し、移動した核を含むように表層の細胞質に区画ができ、胞胚となる。この時、卵子の後極に局在する生殖質（極細胞質）に侵入した核は、この細胞質とともに卵子の外側にくづれ出す。この胞胚後極の表層に並んだ一層の細胞を極細胞と呼び、この細胞は後に胚体の中に取り込まれ、生殖腺の中に入って生殖細胞になる。この細胞群に放射線を照射して死滅させると、生殖腺はできるが中身に生殖細胞のない生殖腺ができる。そのため、ショウジョウバエの生殖細胞は、胚発生初期に形成される極細胞に由来することがわかる⁴⁾ (図4.6)。

(2) アフリカツメガエル

アフリカツメガエルはショウジョウバエと同様に生殖質を卵子の中にもっており、4細胞期までは植物極側に均等に局在している。卵割が進んで桑実胚になった頃には、生殖質はごく限られた割球にだけ分配される。この生殖質が分配された割球は、胚の生殖巣の原基に移動して、生殖細胞になるように運命付けられる。この時期にはまだ外胚葉と内胚葉の区別もなく、アフリカツメガエルの胚においても、ショウジョウバエと同様に、非常に早い時期に、生殖細胞になる運命をもつ細胞が分かれる⁵⁾ (図4.7)。しかし、ショウジョウバエでは生殖巣に入れなかった極細胞は退化するのに対し、アフリカツメガエルの生殖質を含む細胞は、体細胞組織に紛れ込んだ場合、様々な体細胞組織へと分化

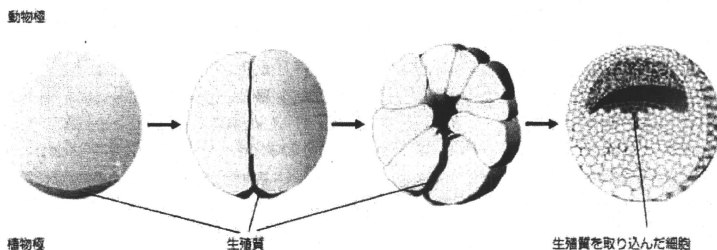


図 4.7 アフリカツメガエルにおける生殖細胞系列の成立過程

することが知られていることから、ショウジョウバエとアフリカツメガエルとは生殖細胞系列として不可逆的に確立される機構が異なると考えられる。

2) 生殖質をもたない動物群における生殖細胞系列の成立

卵子の中に生殖質が認められる動物は70種以上で、輪形、線形、軟体、環形、節足、毛類、脊髄動物門にわたるが、生殖質が報告されていない動物も決して少なくはない。我々哺乳動物も生殖質が卵子内に観察されていない動物の一つである。以下に、マウスにおける生殖細胞系列の成立の具体例を概説する。

生殖質が確認されている動物では、発生のごく初期の段階で生殖細胞になる細胞の運命が決定していた。これに対して、マウスでは胚盤胞の内細胞塊由来の細胞（胚性幹細胞（ES細胞）と呼ばれる）は、すべての組織に分化する能力（全能性）をもっていることから、まだこの時期でも生殖細胞の運命は決定していないと考えられる。では、生殖細胞系列はいつ頃成立するのだろうか。将来的に生殖細胞となる始原生殖細胞はアルカリ性フォスファターゼ活性をもつことから、その性質を利用して、生殖細胞の起源が調べられている。研究の結果、始原生殖細胞が初めて認められるのは7日胚の原腸形成の時期であり、胚外中胚葉領域におよそ8個の大型でアルカリ性フォスファターゼ活性陽性を示す細胞が観察されることから、このころに生殖細胞系列として成立するのではないかと考えられている。その後、これらの細胞は分裂して数を増やし、8.5日胚では尿膜基部周辺に細胞集団を形成するようになる。11.5日胚までにはほとんどが後腸に沿って移動し、生殖腺の原基である生殖隆起に取り込まれる。このように、マウスの場合、始原生殖細胞は胚体の外で分化するので、当然ながら始原生殖細胞は発生する体細胞系列の細胞間をすり抜けながら、哺乳動物の始原生殖細胞に特徴的なアメラ運動によって、生殖隆起まで移動していく⁵⁾（図4.8）。

3) 生殖細胞系列の成立機構の統一的な理解へ

このように、生殖細胞系列の成立に関して、その成立過程や確立時期は動物群によって多様である。したがって、現在のところ、生殖質をもつ動物群と生殖質をもたない動物群における生殖細胞系列の成立機構を統一的に理解することは困難であるように思われる。しかしながら、生殖質が認められていない動物群においても現在は検出する手段が知られていないだけで、生殖質に相当する共通な因子が存在するのではないかという考え方もできる。実際に、生殖質が確認されていないマウスやラットの始原生殖細胞やその形成過程には生殖質に特徴的な nuage と呼ばれる構造が存在することが知られている。

また、生殖質をもつショウジョウバエやカエルなどで生殖細胞系列の成立に関与しているといわれる因子（Vasaタンパク質）と同様の構造をもつ因子（Mvh）が、生殖質をもたないマウスの生殖系列

細胞でもみつがっている。したがって、今後、生殖質が観察される動物群において分子レベルで生殖細胞系列の成立に関する分子が同定できれば、その知見を基に、生殖質が観察されていない動物群における解析が進むことが期待され、これらの動物群で生殖細胞系列の成立機構を統一的に理解することも可能になると思われる。

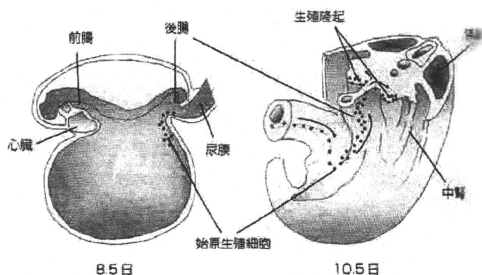


図4.8 マウスにおける生殖細胞系列の成立過程

5. 生殖系列細胞を用いた新技術と応用例

1) 幹細胞の利用・応用

最近、ヒトクローン胚からES細胞を作製し、培養させることに成功した実験研究が報告された。これまでに各国の研究者たちが、ヒツジをはじめネコやウシといった哺乳動物の体細胞核移植によるクローン動物の作出に成功しているものの、ヒトおよびサルなどの霊長類のクローン作出は達成できていなかった。そのため、霊長類のクローン作出には特別な障害があると考えられていたが、ヒトクローン胚からES細胞が作製されたことで、霊長類にも適用可能なクローン技術を確立しつつあると考えられる。しかしながら、ヒト胚を用いたこのような研究の前進は生命倫理的な問題があるとして一部の人は反対意見をもっており、ES細胞を採取する際に胚を破壊することは殺人や傷害と同じ行為であると批判している。そのため、今後、ヒトES細胞に関する研究では慎重な配慮が必要である。いずれにしても、ヒトクローン胚からES細胞が作製されたことで、糖尿病やアルツハイマーなどの疾患によって損傷した細胞の代わりに健康な細胞を移植治療することが可能になると、医療の発展において大きく貢献すると期待される。

2) 生殖系列細胞の作製・応用

生殖系列細胞は身体を構成する細胞の中で、唯一全能性を維持する細胞である。そのため、近年、生殖系列細胞を効率よく利用した新技術の開発や、その応用を目指して、幹細胞研究や生殖工学の開発研究が注目を浴びている。生殖系列細胞は、卵子や精子にも分化する可能性を秘めているのと同時に、適切な培養下で培養することにより無限増殖を獲得するばかりでなく、ES細胞と呼ばれる万能性細胞に戻ることも可能である(図4.9)。ES細胞から生殖細胞を分化させる培養系では、全能性を維持する生殖細胞と全能性を失う体細胞への分化を培養条件下で再現させる必要がある。近年、Vasaという生殖細胞特異的遺伝子の発現を指標にし、ES細胞が特定の培養条件下で生殖細胞に分化することが見出され、さらに分化した生殖細胞が精子になる能力をもっていることが証明された。その後、ES細胞から分化した精子を用いて卵子と受精させることに成功している。このことは、体外培養条件下で作製されたES細胞由来精子が受精能を獲得していることの証明である。これらの研究結果のもつ意義は非常に大きい。治療目的のクローニングやES細胞の育成の基礎的プロセスについての理解が深まると同時に、男性の不妊治療につながる可能性をもっているからである。治療目的でES細胞を利用する場合は、免疫による拒絶反応を避けるために、患者のクローン胚から作り出す必要があるが、クローン胚から採取したES細胞が正常で、治療に利用できるか否かについては不明であった。しかし、このES細胞由来精子が受精能を獲得していたという事実は、ES細胞が治療目的で利用できる可能性を示すものであり、生殖系列細胞を利用した新しい技術の開発、さらにはその実用化への大きな一歩であるといえる。

3) 人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の樹立と応用

近年、多能性を有した人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) が樹立され、再生医療への応用が期待されている。再生医療の目標は、細胞、組織、器官そのもの、またそれらの機能を再生させることによって病気の治療を行うことである。iPS細胞が樹立される前はES細胞を用いて、組織や器官を構築する研究が主に行われてきた。しかしながら、ES細胞は順調に成長すれば生命になる受精卵を利用しているため、倫理的に大きな問題を抱えている。iPS細胞の樹立技術では、受精卵でない細胞に様々な種類の細胞に変化

する能力をもたせることができるため、再生医療の研究を加速することができると同時に創薬の開発や新薬の探索などに有用であると期待されている。さらに、*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* に *Tbx3* を加えることでiPS細胞の生殖系列寄与能が向上することが報告されている。この生殖系列に寄与するiPS細胞は、最新の生殖工学を駆使して生殖系列細胞を希少動物の維持・増殖に応用する方法の開発に寄与することが予想される。希少動物の保護・増殖は、生物資源の保全のためだけでなく、生物多様性の維持にも重要である。

4) 生殖系列細胞を用いた技術開発と応用

生物多様性の観点から、希少動物の維持・増殖の方法として現在考えられているのは、生殖系列細胞の体外培養法の開発、生殖系列細胞に対する操作技術の確立、生殖系列への分化調節遺伝子の特定とその応用である。このような生殖系列細胞を用いた技術開発のためには、広範な動物種から生殖系列細胞を効率よく分離採取する必要がある。哺乳動物および鳥類において始原生殖細胞の大量採取を可能にするためには、その起源となる胚部域を特定して未分化細胞から体外培養法を用いて大量の始原生殖細胞を増殖させる必要がある。これらの技術を開発統合することによって希少動物の保護を目的とした維持・増殖が可能となる。このように、将来的に生殖系列細胞を利用した新技術は、再生医療や不妊治療のような医学領域だけではなく、希少動物の保護や優良動物の作出など幅広い分野においても存在感を発揮するようになることが期待される。

(横尾正樹、清水 隆、佐藤英明)

文 献

- 1) 毛利秀雄：生殖系列-親から子への生命の流れ、第7回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編、1993。
- 2) 佐藤英明：動物生殖学、p.1-10、朝倉書店、2003。
- 3) 岡田益吉ほか：生殖細胞-形態から分子へ、p.1-12、

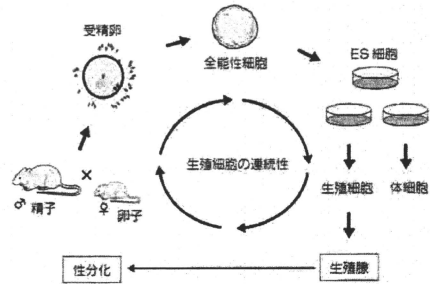


図 4.9 生殖系列細胞の利用とその連続性

共立出版、1996。

- 4) 岡田益吉：卵から親へ-生命の発生、第6回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編、1992。
- 5) Gilbert SF: *Developmental Biology*, 6th Edition, Sinauer Associates, 2000.

